热胁迫下棉花粉蚧内参基因的筛选

陈 芳, 陆永跃*

(华南农业大学昆虫学系, 广州 510642)

摘要:【目的】筛选出热胁迫下棉花粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* 的实时定量 PCR 最适内参基因。【方法】本研究应用实时荧光定量 PCR 技术测定了棉花粉蚧 2 龄若虫、3 龄若虫和雌成虫 *α-tub*, *β-tub*, *rpl32*, *GAPDH*, *SDHA* 和 *TBP* 共 6 个候选内参基因在 7 个不同温度处理(恒温 18℃和 32℃, 以及 37℃, 39℃, 41℃, 43℃和 45℃热激处理 1 h 并在 26℃恢复 1 h)下 mRNA 表达水平的稳定性;应用 geNorm, Bestkeeper, Normfinder 和 RefFinder 软件分析 6 个基因表达的稳定性。【结果】在不同高温胁迫下 2 龄若虫 6 个候选内参基因的稳定值 M 由小到大依次为 *α-tub*(0.579) < *GAPDH*(0.654) < *TBP*(0.663) < *β-tub*(0.668) < *rpl32*(0.675) < *SDHA*(0.755), SD 值排序为 *TBP*(0.31) < *α-tub*(0.37) < *rpl32*(0.38) < *SDHA*(0.52) < *β-tub*(0.53) < *GAPDH*(0.57);3 龄若虫 6 个候选内参基因的稳定值 M 由小到大依次为 *α-tub*(0.542) < *β-tub*(0.596) < *TBP*(0.618) < *GAPDH*(0.655) < *SDHA*(0.668) < *rpl32*(0.749), SD 值排序为 *α-tub*(0.29) < *β-tub*(0.40) < *rpl32*(0.45) < *TBP*(0.49) < *GAPDH*(0.50) < *SDHA*(0.55);雌成虫 6 个候选内参基因的稳定值 M 由小到大依次为 *rpl32*(0.554) < *α-tub*(0.635) < *GAPDH*(0.662) < *β-tub*(0.666) < *SDHA*(0.704) < *TBP*(0.837), SD 值排序为 *rpl32*(0.31) < *α-tub*(0.35) < *GAPDH*(0.44) < *TBP*(0.44) < *β-tub*(0.48) < *SDHA*(0.71)。RefFinder 综合排序结果表明,在 7 个不同温度处理下 2 龄若虫和 3 龄若虫中 *α-tub* 最稳定,雌成虫中 *rpl32* 最稳定。【结论】*α-tub* 可作为棉花粉蚧 2 龄若虫和 3 龄若虫的内参基因,*rpl32* 可作为雌成虫的内参基因。本结果为进一步开展热胁迫下棉花粉蚧热激蛋白基因的表达规律研究提供了参照。

关键词: 棉花粉蚧; 温度; 热胁迫; 内参基因; 表达稳定性; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2014)10-1146-09

Selection of reference genes in *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) under heat stress

CHEN Fang, LU Yong-Yue* (Department of Entomology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Aim】To select the suitable reference genes in *Phenacoccus solenopsis* after exposure to different temperature stress by using quantitative real-time PCR (RT-qPCR).【Methods】In this study, we investigated the mRNA expression stability of six candidate reference genes (*α-tub*, *GAPDH*, *rpl32*, *β-tub*, *SDHA* and *TBP*) in different developmental stages (2nd instar nymph, 3rd instar nymph and female adult) of *P. solenopsis* under seven different temperature regimes (constant temperature 18℃ and 32℃, and temporary heat shock (1 h) at 37℃, 39℃, 41℃, 43℃ and 45℃ and then recovery at 26℃ for 1 h) by RT-qPCR method. Three software-based approaches (geNorm, Bestkeeper and Normfinder) and one web-based comprehensive tool (RefFinder) were used to analyze and rank the tested genes, and evaluate the expression stability of these genes.【Results】In the 2nd instar nymphs, the M values of six reference genes stability in the ascending order were *α-tub* (0.579) < *GAPDH* (0.654) < *TBP* (0.663) < *β-tub* (0.668) < *rpl32* (0.675) < *SDHA* (0.755), and the SD values were *TBP* (0.31) < *α-tub* (0.37) < *rpl32* (0.38) < *SDHA* (0.52) < *β-tub* (0.53) < *GAPDH* (0.57). In the 3rd instar nymphs, the M values in the ascending order were *α-tub* (0.542) < *β-tub* (0.596) < *TBP* (0.618) < *GAPDH* (0.655) < *SDHA* (0.668) < *rpl32*(0.749), while the SD values were *α-tub* (0.29) < *β-tub* (0.40) < *rpl32* (0.45) < *TBP* (0.49) < *GAPDH* (0.50) < *SDHA* (0.55). The M values in female adults in the ascending order were *rpl32* (0.554) < *α-tub* (0.635) < *GAPDH* (0.662) < *β-tub* (0.666) < *SDHA* (0.704) < *TBP* (0.837), and the SD values were *rpl32* (0.31) < *α-tub* (0.35) < *GAPDH* (0.44) <

基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2013010013526); 广东省研究生教育创新计划项目(2013JDXM14)

作者简介: 陈芳, 女, 1989 年 11 月生, 江西鹰潭人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生态学, E-mail: chenfang008@foxmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: luyongyue@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-06-12; 接受日期 Accepted: 2014-09-09

SDHA (0.44) < *β-tub* (0.48) < *TBP* (0.71). According to the comprehensive rank of RefFinder, *α-tub* was the most stable for the 2nd and 3rd instar nymph, while *rpl*32 for female adult under seven different temperature regimes. 【Conclusion】*α-tub* can be used as a reference gene for the 2nd and 3rd instar nymph, and *rpl*32 could be used as the reference gene for female adult. This study provides an accurate reference for future study of the heat shock protein gene expression in *P. solenopsis* under heat stress.

Key words: *Phenacoccus solenopsis*; temperature; heat stress; reference genes; expression stability; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR)

实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)实现了聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)从定性到定量的飞跃,具有重复性好、灵敏度高、定量准确、速度快等优点,已成为分子生物学研究中分析基因表达的重要工具(Heid *et al*., 1996; Haller *et al*., 2004; Ransbotyn and Reusch, 2006; Yoo *et al*., 2009)。利用 RT-qPCR 方法计算基因相对表达量时,通常需引入一个表达较为稳定的管家基因作为内参基因(reference gene)(吴文凯等, 2009)。在昆虫学研究中,常用的稳定表达的管家基因有甘油醛-3-磷酸-脱氢酶基因(*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*)(Radonic *et al*., 2004; Scharlaken *et al*., 2008),微管蛋白基因(*tubulin*)(Heid *et al*., 1996; Haller *et al*., 2004; Ransbotyn *et al*., 2006; Yoo *et al*., 2009),核糖体蛋白基因(*ribosomal protein L32*)(Ahn *et al*., 2008; Matta *et al*., 2011),琥珀酸脱氢酶复合体 A 亚基基因(*succinate dehydrogenase complex, subunit A*, *SDHA*)(岳秀利等, 2013),以及 TATA 框结合蛋白基因(*TATA-box-binding protein*, *TBP*)等(Peng *et al*., 2012)。理想的内参基因应在各种类型的组织、细胞和各种实验因素条件下均恒定表达。然而,近年来大量的研究结果表明并没有表达绝对稳定的基因,任何一种管家基因的所谓恒定表达都只是在一定类型的细胞或实验因素作用下“有范围”的恒定(Andersen *et al*., 2004; 张艳君等, 2007),因此,传统的管家基因不再是通用的 RT-qPCR 内参基因,对于特定的实验应该首先评估内参基因的稳定性,选择最合适的内参基因来进行 RT-qPCR 分析(Bustin *et al*., 2009)。geNorm(Vandesompele *et al*., 2002), NormFinder(Andersen *et al*., 2004)和 Best-Keeper(Pfaffl *et al*., 2004)等程序已广泛应用于内参基因的筛选与评价。Xie 等(2011)将这上述 3 种分析方法整合成一个网上综合分析工具——RefFinder (http://www.leonxie.com/referencegene.php),用于各种试验条件下内参基因筛选与评价,能够得到与单独使用各种分析方法一致的结果,并能综合评价上述 3 种分析方法的结果,避免了单个分析方法分析的片面性。目前,国内外研究者已在多种昆虫的内参基因研究中应用了上述分析方法(杨顺义等, 2013)。在昆虫分子生物学研究中已有对多种昆虫筛选稳定的内参基因的报道,例如西方蜜蜂 *Apis mellifera*(Lourenco *et al*., 2008; Scharlaken *et al*., 2008)、大豆蚜 *Aphis glycines*(Bansal *et al*., 2012)、小菜蛾 *Plutella xylostella*(符伟等, 2012)、红火蚁 *Solenopsis invicta*(Cheng *et al*., 2013)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*(Lu *et al*., 2013)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(Yuan *et al*., 2014)、烟粉虱 *Bemisia tabaci*(Liang *et al*., 2014)等。

棉花粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 属半翅目、粉蚧科,是一种危害园林、水果、大田作物的害虫(Tinsley, 1898; 陆永跃等, 2009; 武三安和张润志, 2009; 孙峰和陆永跃, 2011; Huang *et al*., 2013),该虫具有较强的生态可塑性,对高温具有较强的适应能力(关鑫等, 2011; 丁吉同等, 2013),据观察,该虫在广东地区年生活史中,其发生高峰出现在夏季 7-8月的高温期,表明该虫喜高温(马骏等, 2011)。目前国内外关于棉花粉蚧生物学和生态学的研究较多,而对该虫分子生物学研究相对较少(Lu *et al*., 2011; Guan *et al*., 2012a, 2012b; Fand *et al*., 2014; Thomas *et al*., 2014),关于该虫定量表达分析内参基因的研究尚未见报道,对棉花粉蚧抗逆温的分子机制也未见研究。众多分子技术中,目前实时定量 PCR 是研究基因表达水平最有效的手段(Bustin *et al*., 2009)。为了保证目标基因表达水平实时定量 PCR 结果的准确性,引入了内参基因作为参照(Derveaux *et al*., 2010)。理想的内参基因应在各种实验条件下,其表达水平不应发生太大变化,因此在进行定量 PCR 实验之前,应该对其所用内参基因的稳定性进行评价。本文在前期测序获得该虫全转录

组基础上，采用 RT-qPCR 方法研究了 *α-tub*，*GAPDH*，*rpl32*，*β-tub*，*SDHA* 和 *TBP* 共 6 个常用内参基因在棉花粉蚧同一虫期热胁迫下的表达水平，使用 geNorm，Normfinder，Bestkeeper 和 RefFinder 软件分析了热胁迫下这些基因的表达稳定性，筛选出了合适的内参基因。本研究为以后在棉花粉蚧相关基因表达水平研究中选择内参基因提供了参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源与温度处理

棉花粉蚧来源于华南农业大学昆虫学系昆虫生态学实验室，用新鲜棉叶饲养于人工气候箱内，温度为 26±1℃，相对湿度为 70%±5%，光周期为 14L∶10D，获得大小均一的健康的各个供试虫态。

将棉花粉蚧分别置于 18℃ 和 32℃ 人工气候箱中，并用棉花饲养 3 代以上，分别取 18℃ 和 32℃ 恒温种群；将 26℃ 恒温种群置于 37℃，39℃，41℃，43℃ 和 45℃ 下热激 1 h 后在 26℃ 下恢复 1 h 的 2 龄若虫、3 龄若虫和雌成虫组成的 21 个样本，以置于 26℃ 的 2 龄若虫、3 龄若虫和雌成虫为对照（3 次重复）。将所有样本放入液氮中速冻，置于 –80℃ 下储存备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

按照 Trizol 试剂的使用说明提取棉花粉蚧总 RNA。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性，经 NanoDrop 2000 Spectrophotometer（Thermo，USA）核酸浓度测定仪测定其浓度和纯度，将每个温度处理条件下提取得到的总 RNA 浓度稀释至 1.5 μg/mL，纯度控制在 1.8 ~ 2.0 之间。按照 Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒（TIANGEN 公司）的操作说明反转录合成第一链 cDNA，并稀释 2 倍保存在 –20℃ 冰箱备用。

1.3 引物设计

根据棉花粉蚧转录组中的相关信息，筛选出 *α-tub*（KJ909508），*β-tub*（KJ909511），*rpl32*（KJ909510），*GAPDH*（KJ909509），*SDHA*（KM098145）和 *TBP*（KM098146）6 个内参基因序列，使用在线引物设计软件 NCBI Primer-BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/）设计引物。为确保引物的特异性，设计时确保引物对棉花粉蚧转录组中的非目的基因至少有 2 个错配。引物序列见表 1，由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测中所用的 6 个候选内参基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of six candidate reference genes used in RT-qPCR analysis

基因 Gene	引物序列（5′–3′） Primer sequences	扩增片段（bp） Product size	扩增效率（%） Amplification efficiency	R^2
α-tubulin	F：CTGGTAAACACGTTCCCCGAG R：TGTAATGACCGCGAGCGTAG	152	104.20	0.998
GAPDH	F：AAAATGTCGGCCCCTGGTAA R：TCGTTGATGGCGCATACAGT	107	108.70	0.992
rpl32	F：TCGTAGGAGATTCAAAGGCCA R：GTTCACGGACGTTATGGACGA	119	110.30	0.995
β-tubulin	F：AAAATGTCGGCCCCTGGTAA R：TCGTTGATGGCGCATACAGT	125	113.50	0.998
SDHA	F：GTTATGCCCCTGTTGCCAAA R：TGTTCCGGTGGCAAATGATG	139	96.6	0.988
TBP	F：CGAAAGTCACGCTCAGTTCA R：AGCTTGCTGTAATTCCTCGC	151	111.9	0.989

1.4 目的片段的普通 PCR 扩增

PCR 反应体系中分别加入 2.5 μL 10×PCR buffer，2.0 μL 10 mmol/L dNTPs，1.0 μL 10 μmol/L 正向引物，1.0 μL 10 μmol/L 反向引物，0.2 μL 5 U/μL Taq 和 1.5 μL 的模板，加无菌水补至总体积 25 μL。反应条件为：94℃ 预变性 2 min；94℃ 变性 15 s，54℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，35 个循环；72℃ 延伸 1 min，用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 标准曲线的制作和 RT-qPCR

RT-qPCR 反应体系为 20 μL：10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ II（大连宝生物公司），7 μL 双蒸水，10 μmol/L 的上下游引物各 0.8 μL，cDNA 模板 1.0 μL，0.4 μL ROX，混匀，轻微离心，反应在 StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-time PCR Systems 实时荧光定量 PCR 仪（MX3005P）进行，反应条件为：95℃ 预变

性 10 min；然后 95℃变性 30 s，54℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，进行 40 个循环；最后在 54～95℃进行融解曲线分析，经熔解曲线分析确认所设计的引物没有非特异扩增及引物二聚体后，将 cDNA 模板按 1∶10稀释成 5 个浓度梯度进行标准曲线分析，并计算不同引物的扩增效率。每个处理 3 次重复。

1.6　数据处理和分析

数据分析采用内参基因评价软件 geNorm（Vandesompele *et al.*, 2002），Normfinder（Anderson *et al.*, 2004）和 Bestkeeper（Pfaffl *et al.*, 2004）进行评估分析。具体操作为：在 Excel2003 中将不同样本中某一内参基因 Ct 值最小者对应样品的表达量定义为 1，其他样品内参基因的相对表达量则为 $2^{\Delta Ct}$（ΔCt = 各样本 Ct 值 − 最小 Ct 值），将这些数据导入 geNorm 程序后通过 Calculate 命令利用 geNorm 程序计算基因表达稳定度 M 值，M 值越小，内参基因越稳定；反之，越不稳定，其中 M = 1.5 为上限（Niu *et al.*, 2012），只有 M 值小于 1.5 的基因才被认为表达相对稳定。Normfinder 与 geNorm 相似，仍需要进行原始数据的 $2^{\Delta Ct}$转换后进行运算，其主要利用方差分析对内参基因表达稳定性进行直接评价，产生基因表达稳定值（stability value），然后根据稳定值的大小排序，从而可以确定最稳定的基因。Bestkeeper 可以直接输入原始数据，通过计算标准偏差（*SD*）、变异系数（*CV*）和每个基因的相关系数（*r*），根据各个值的大小比较来筛选最稳定的内参基因，其中标准差和变异系数越小，稳定性越好；反之，稳定性越差。其次用 RefFinder 综合评价上述 3 种方法的分析结果，能避免单个分析方法的片面性。此外利用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析对原始 Ct 值进行多重比较，以 Tukey 氏方法检验，显著水平为 $P < 0.05$。最后根据 RefFinder 的综合排名来确定内参基因。

2　结果与分析

2.1　棉花粉蚧内参基因的荧光定量 PCR 分析

以棉花粉蚧 cDNA 为模板，进行的实时荧光定量 PCR 分析结果表明 6 个内参基因引物扩增的熔解曲线都只有明显的单一峰，说明所用引物都能特异性地扩增各内参基因的相应产物，不存在引物二聚体；且每个待测样品的 PCR 扩增曲线的重复性也非常好，6 个基因的扩增效率为 96.6%～113.5%，R^2 值均在 98% 以上，说明实时荧光定量 PCR 的结果是准确可信的。

同一虫期不同温度下 6 个基因表达水平都有一定变化（图 1）。不同温度下 2 龄若虫 *rpl*32 的 Ct 值波动范围为 12.5～14.16（*P* = 0.156），*SDHA* 的 Ct 值波动范围为 16.73～19.08（*P* = 0.154），*TBP* 的 Ct 值波动范围为 18.55～20.46（*P* = 0.103），各组

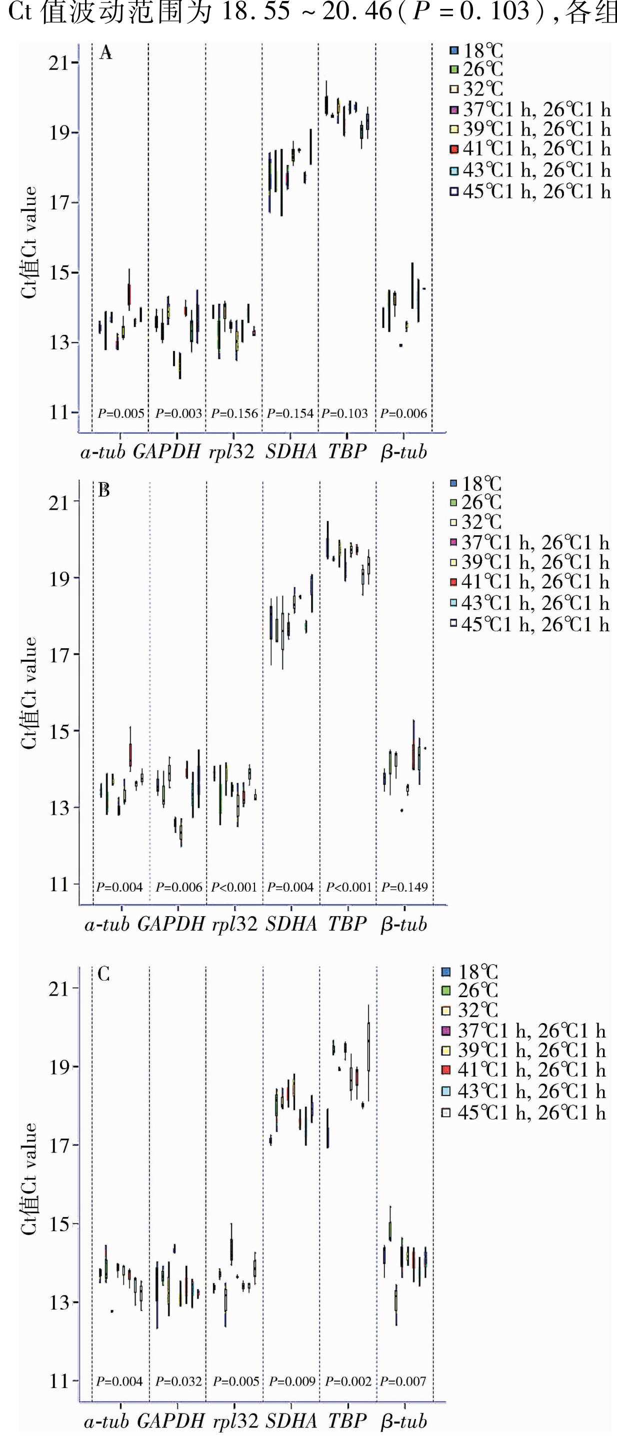


图 1　不同温度处理下棉花粉蚧 6 个内参基因的 Ct 值

Fig. 1　Threshold cycle (Ct) values of six reference genes in *Phenacoccus solenopsis* under different temperature regimes

A：2 龄若虫 2nd instar nymph；B：3 龄若虫 3rd instar nymph；C：雌成虫 Female adult.

间的 Ct 值均无显著差异，另外 3 个内参基因 *α-tub*，*GAPDH* 和 *β-tub* 的 Ct 值波动范围为 *α-tub*：12.81 ~ 15.09，*GAPDH*：11.98 ~ 14.5，*β-tub*：12.89 ~ 15.27；各组间表达水平存在显著差异（分别为 $P=0.005$，$P=0.003$，$P=0.046$）（图 1：A）。不同温度下 3 龄若虫 *β-tub* 的 Ct 值波动范围为 13.32 ~ 15.27（$P=0.149$），各组间的 Ct 值无显著差异，另外 5 个内参基因 *α-tub*，*GAPDH*，*rpl32*，*SDHA* 和 *TBP* 的 Ct 值波动范围为 *α-tub*：13.09 ~ 15.09，*GAPDH*：11.98 ~ 14.5，*β-tub*：13.03 ~ 15.27，*SDHA*：17.04 ~ 19.32，*TBP*：18.84 ~ 20.63，各组间表达水平均存在显著差异（分别为 $P=0.005$，$P=0.006$，$P<0.001$，$P=0.004$，$P<0.001$）（图 1：B）。不同温度下雌成虫 *GAPDH* 的 Ct 值波动范围为 12.34 ~ 14.46（$P=0.132$），各组间 Ct 值无显著差异，另外 5 个内参基因 *α-tub*，*rpl32*，*β-tub*，*SDHA* 和 *TBP* 的 Ct 值变化范围为 *α-tub*：12.75 ~ 14.45，*rpl32*：12.38 ~ 15，*β-tub*：12.42 ~ 15.44，*SDHA*：16.99 ~ 18.81，*TBP*：16.93 ~ 20.56，各组间表达水平存在显著差异（分别为 $P=0.004$，$P=0.005$，$P=0.007$，$P=0.009$，$P=0.002$）（图 1：C）。

2.2 内参基因的选择

应用 geNorm，BestKeeper 和 Normfinder 软件及 RefFinder 在线分析工具对同一虫期不同温度的所有样品的 6 个候选内参基因表达的稳定性进行评价（表 2）。除了对 3 龄若虫 Bestkeeper 分析结果显示 *TBP* 最稳定，而 geNorm 和 Normfinder 分析结果显示 *a-tub* 最稳定这点不同之外，这 3 种软件的分析结果基本相同，最后根据 RefFinder 的综合分析结果 3 龄若虫期选择 *a-tub* 为最优内参基因（表 2）。

应用 geNorm 分析结果显示，*α-tub*，*GAPDH*，*rpl32*，*β-tub*，*SDHA* 和 *TBP* 6 个候选内参基因的表达稳定度 M 值 2 龄若虫为 *α-tub*（0.579），*GAPDH*（0.654），*TBP*（0663），*β-tub*（0.668），*rpl32*（0.675），*SDHA*（0.755）（图 2：A），3 龄若虫为 *α-tub*（0.542），*β-tub*（0.596），*TBP*（0.618），*GAPDH*（0.655），*SDHA*（0.668），*rpl32*（0.749）（图 2：B），雌成虫为 *rpl32*（0.554），*α-tub*（0.635），*GAPDH*（0.662），*β-tub*（0.666），*SDHA*（0.704），*TBP*（0.837）（图 2：C）。不同虫期的 6 个内参基因 M < 1.5，均可作为内参基因使用，*α-tub* 在 2 龄和 3 龄若虫中表达最稳定，*rpl32* 在雌成虫中表达最稳定。同样，应用 Normfinder 计算结果表明，2 龄粉蚧若虫 6 个内参基因的稳定性大小排序为：*α-tub*（0.202）> *GAPDH*（0.317）> *TBP*（0.323）> *β-tub*（0.335）> *rpl32*（0.338）> *SDHA*（0425），3 龄若虫为：*α-tub*（0.178）> *β-tub*（0.257）> *TBP*（0.294）> *GAPDH*（0.330）> *SDHA*（0.349）> *rpl32*（0.434），雌成虫为：*rpl32*（0.131）> *α-tub*（0.299）> *GAPDH*（0.316）

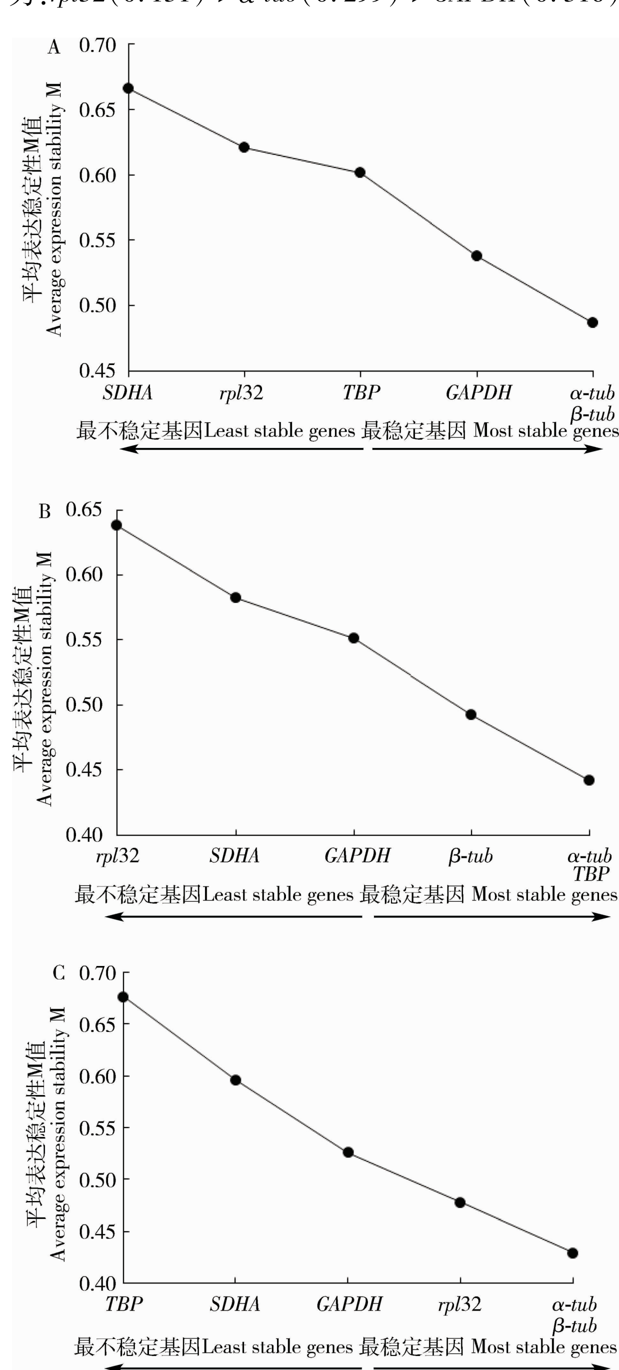


图 2 应用 geNorm 软件分析获得棉花粉蚧不同虫期各内参基因的表达稳定值（M）

Fig. 2 Expression stability values (M) of reference genes in different developmental stages of *Phenacoccus solenopsis* analyzed by geNorm

A：2 龄若虫 2nd instar nymph；B：3 龄若虫 3rd instar nymph；C：雌成虫 Female adult.

＞*β-tub*（0.333）＞*SDHA*（0.357）＞*TBP*（0.502）。2龄和3龄若虫中*α-tub*稳定值最小，雌成虫中*rpl32*稳定值最小，是最优内参基因。Bestkeeper分析显示2龄若虫，3龄若虫和雌成虫中6个候选内参基因的*SD*＜1.0，*TBP*，*α-tub*和*rpl32*分别在这3个虫期中表达最稳定（表3～5）。

表2　不同温度处理下棉花粉蚧不同虫期内参基因表达稳定性分析

Table 2　Rank of reference genes based on their expression stability in different developmental stages of *Phenacoccus solenopsis* under different temperature regimes

表达稳定性 Expression stability	geNorm			Bestkeeper			Normfinder			RefFinder		
	2龄若虫 2nd instar nymph	3龄若虫 3rd instar nymph	雌成虫 Female adult	2龄若虫 2nd instar nymph	3龄若虫 3rd instar nymph	雌成虫 Female adult	2龄若虫 2nd instar nymph	3龄若虫 3rd instar nymph	雌成虫 Female adult	2龄若虫 2nd instar nymph	3龄若虫 3rd instar nymph	雌成虫 Female adult
稳定性最好 Most stable	*α-tub*	*α-tub*	*rpl32*	*TBP*	*α-tub*	*rpl32*	*α-tub*	*α-tub*	*rpl32*	*α-tub*	*α-tub*	*rpl32*
	GAPDH	*β-tub*	*α-tub*	*α-tub*	*β-tub*	*α-tub*	*GAPDH*	*β-tub*	*α-tub*	*TBP*	*β-tub*	*α-tub*
↑	*TBP*	*TBP*	*GAPDH*	*rpl32*	*rpl32*	*GAPDH*	*TBP*	*TBP*	*GAPDH*	*GAPDH*	*TBP*	*β-tub*
	β-tub	*GAPDH*	*β-tub*	*SDHA*	*TBP*	*SDHA*	*β-tub*	*GAPDH*	*β-tub*	*β-tub*	*GAPDH*	*GAPDH*
稳定性最差	*rpl32*	*SDHA*	*SDHA*	*β-tub*	*GAPDH*	*β-tub*	*rpl32*	*SDHA*	*SDHA*	*rpl32*	*rpl32*	*SDHA*
Least stable	*SDHA*	*rpl32*	*TBP*	*GAPDH*	*SDHA*	*TBP*	*SDHA*	*rpl32*	*TBP*	*SDHA*	*SDHA*	*TBP*

表3　应用Bestkeeper软件分析不同温度处理下棉花粉蚧2龄若虫内参基因的表达稳定性

Table 3　Expression stability of reference genes in the 2nd instar nymphae of *Phenacoccus solenopsis* under different temperature regimes analyzed by Bestkeeper

参数 Parameters	基因 Genes					
	TBP	*α-tub*	*rpl32*	*SDHA*	*β-tub*	*GAPDH*
样本数 n	24	24	24	24	24	24
Geo 均值 Geo Mean[Cq]	19.5	13.54	13.48	17.99	13.94	13.33
Ar 均值 Ar Mean[Cq	19.5	13.55	13.49	18.00	13.95	13.35
最小值 min[Cq]	18.55	12.81	12.50	16.62	12.89	11.98
最大值 max[Cq]	20.46	15.09	14.16	19.08	15.27	14.50
标准差 *SD*[±Cq]	0.31	0.37	0.38	0.52	0.53	0.57
变异系数 *CV*[%Cq]	1.59	2.75	2.79	2.9	3.81	4.27
X-fold 最小值 min[x-fold]	−1.93	−1.66	−1.98	−2.58	−2.07	−2.55
X-fold 最大值 max[x-fold]	1.95	2.92	1.6	2.13	2.51	2.25
X-fold 标准差 *SD*[±x-fold]	1.24	1.30	1.30	1.44	1.45	1.48
稳定性排名 Stability ranking	1	2	3	4	5	6

表4　应用Bestkeeper软件分析不同温度处理下棉花粉蚧3龄若虫内参基因的表达稳定性

Table 4　Expression stability of reference genes in the 3rd instar nymphae of *Phenacoccus solenopsis* under different temperature regimes analyzed by Bestkeeper

参数 Parameters	基因 Genes					
	α-tub	*β-tub*	*rpl32*	*TBP*	*GAPDH*	*SDHA*
样本数 n	24	24	24	24	24	24
Geo 均值 Geo Mean[Cq]	13.67	14.18	13.70	19.69	13.34	18.19
Ar 均值 Ar Mean[Cq]	13.68	14.19	13.72	19.70	13.36	18.20
最小值 Min[Cq]	13.09	13.32	12.50	18.84	13.18	17.04
最大值 Max[Cq]	15.09	15.27	14.84	20.63	14.50	19.32
标准差 *SD*[±Cq]	0.29	0.40	0.45	0.49	0.50	0.55
变异系数 *CV*[%Cq]	2.14	2.84	3.26	2.48	3.77	3.01
X-fold 最小值 Min[x-fold]	−1.50	−1.82	−2.30	−1.80	−2.58	−2.22
X-fold 最大值 Max[x-fold]	2.67	2.12	2.20	1.92	2.23	2.19
X-fold 标准差 *SD*[±x-fold]	1.22	1.32	1.36	1.40	1.42	1.46
稳定性排名 Stability ranking	1	2	3	4	5	6

表 5 应用 Bestkeeper 软件分析不同温度处理下棉花粉蚧雌成虫内参基因的表达稳定性
Table 5 Expression stability of reference genes in female adults of *Phenacoccus solenopsis* under different temperature regimes analyzed by Bestkeeper

参数 Parameters	基因 Genes					
	*rpl*32	*a-ub*	*GAPDH*	*SDHA*	*β-tub*	*TBP*
样本数 n	24	24	24	24	24	24
Geo 均值 Geo Mean[Cq]	13.59	13.52	13.46	17.86	14.01	18.72
Ar 均值 Ar Mean[Cq]	13.60	13.53	13.47	17.86	14.02	18.74
最小值 Min[Cq]	12.38	12.75	12.34	16.99	12.42	16.93
最大值 Max[Cq]	15.00	14.45	14.46	18.81	15.44	20.56
标准差 *SD*[±Cq]	0.31	0.35	0.44	0.44	0.48	0.71
变异系数 *CV*[%Cq]	2.31	2.56	3.25	2.44	3.43	3.76
X-fold 最小值 Min[x-fold]	-2.31	-1.71	-2.17	-1.82	-3.00	-3.46
X-fold 最大值 Max[x-fold]	2.66	1.9	2.01	1.94	2.7	3.57
X-fold 标准差 *SD*[±x-fold]	1.24	1.27	1.35	1.35	1.4	1.63
稳定性排名 Stability ranking	1	2	3	3	5	6

3 讨论

为了获得更准确、可靠的实时荧光定量 PCR 结果,除了需要合理的试验与引物设计之外,试验过程中的每一步要求都很严格,包括 RNA 的提取质量、聚合酶的扩增效率、cDNA 的合成以及 PCR 准备过程中的准确操作和防止污染等(Vandesompele *et al.*, 2002)。此外,选择合适的内参基因也是极其重要的一个环节。由于受内外环境的影响,在细胞中真正恒定表达的基因并不存在。杨丽红(2011)对柑橘全爪螨的研究结果表明,在不同发育阶段稳定性较好的是 *PcRpII*,在低温胁迫和高温胁迫下稳定性较好的分别是 *Pcα-tubulin* 和 *PcRpII*。岳秀利等(2013)对二斑叶螨内参基因的筛选结果表明,*α-tubulin* 在 8 个内参基因(5.8S rRNA, *α-tubulin*, *β-actin*, *ELF*, *GAPDH*, *RPL13a*, *SDHA* 和 *TBP*)中的稳定性最好。对斜纹夜蛾内参基因稳定性分析结果表明在不同发育阶段 *GAPDH* 和 *UCCR* 最稳定,不同组织部位 *RPL*10, *AK* 和 *EF*1 最稳定,不同种群中 *RPL*10 和 *EF*1 最稳定,不同温度处理下 *GAPDH* 和 *EF*1 最稳定(Lu *et al.*, 2013)。然而,理想的内参基因在不同的组织、细胞及不同的实验条件下的表达只是相对稳定,也有研究表明传统的内参基因 *GAPDH* 在番茄种子萌发中甘露聚糖酶基因分析中表达量却显著上调(Yan *et al.*, 2013)。因此,必须根据不同的试验对象、试验目的和试验条件选择合适的内参基因。

目前最常用的用于内参稳定性评价的 3 种软件分别是 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper。本研究中 3 种软件评价结果基本一致,但 3 种软件因分析方法不同存在一定的差异,在热胁迫下粉蚧 3 龄若虫内参基因的筛选中, Bestkeeper 显示 *α-tub* 最稳定,然而 geNorm 和 Normfinder 显示 *rpl*32 最稳定。这时可以借助 RefFinder,其整合了 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 等软件结果,可以得出一个最终综合排名结果,使结果更加可靠。随着棉花粉蚧转录组的成功测序,实时定量 PCR 将更广泛应用于棉花粉蚧目的基因的功能研究,本研究为开展棉花粉蚧功能基因的表达分析奠定了基础。

参考文献(References)

Ahn K, Huh JW, Park SJ, Kim DS, Ha HS, Kim YJ, Lee JR, Chang KT, Kim HS, 2008. Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of *Rhesus monkey* (Macacamulatta) tissues. *BMC Molecular Biology*, 9(1): 78.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15): 5245-5250.

Bansal R, Mamidala P, Mian MR, Mittapalli O, Michel AP, 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 105(4): 1432-1438.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611-622.

Cheng DF, Zhang ZL, He XF, Liang GW, 2013. Validation of reference genes in *Solenopsis invicta* in different development stages, castes and tissues. *PLoS ONE*, 8(2): e57718.

Dervesux S, Vandesompele J, Hellemans J, 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4): 227–230.

Ding JT, Adili S, Hu CZ, 2013. Studies on impact of high temperature and relative humidity on survival rates of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 36(5): 387–390. [丁吉同，阿地力·沙塔尔，胡成志，2013. 温度和相对湿度对扶桑绵粉蚧存活率的影响研究. 新疆农业大学学报，36(5): 387–390]

Fand BB, Tonnang HEZ, Kumar M, Kamble AL, Bal SK, 2014. A temperature-based phenology model for predicting development, survival and population growth potential of the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Crop Protection*, 55: 98–108.

Fu W, Xie W, Zhang Z, Wu QJ, Wang SL, Zhang YJ, 2012. Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to Bt toxin. *Acta Entomologica Sinica*, 55(12): 1406–1412. [符伟，谢文，张卓，吴青君，王少丽，张友军，2012. Bt毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报，55(12): 1406–1412]

Guan X, Lu YY, Zeng L, 2012a. Study on developmental durations and fecundity of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley on four species of hosts. *Agricultural Science and Technology*, 13(2): 408–411.

Guan X, Lu YY, Zeng L, Yang YZ, 2012b. Life tables of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley experimental population at different temperatures. *Agricultural Science and Technology*, 13(4): 792–797, 814.

Guan X, Zeng L, Hu XN, Lu YY, Ma J, 2011. Lethal effect of hot water on the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. *Plant Quarantine*, 25(1): 1–5. [关鑫，曾玲，胡学难，陆永跃，马骏，2011. 热水处理对扶桑绵粉蚧的致死作用. 植物检疫，25(1): 1–5]

Haller F, Kulle B, Schwager S, Gunawan B, Heydebreck AV, Sültmann H, Füzesi L, 2004. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Analytical Biochemistry*, 335(1): 1–9.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10): 986–994.

Huang J, Zhang PJ, Zhang J, Lu YB, Huang F, Li MJ, 2013. Chlorophyll content and chlorophyll fluorescence in tomato leaves infested with an invasive mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Environmental Entomology*, 42(5): 973–979.

Liang P, Guo Y, Zhou X, Gao X, 2014. Expression profiling in *Bemisia tabaci* under insecticide treatment: indicating the necessity for custom reference gene selection. *PLoS ONE*, 9(1): e87514.

Lourenco AP, Mackert A, Cristino AS, Simoes ZLP, 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honeybee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3): 372–385.

Lu Y, Yuan M, Gao X, Kang T, Zhan S, Wan H, Li J, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.

Lu YY, Guan X, Zeng L, 2011. Effect of temperature on the development of the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Scientific Research and Essays*, 6(31): 6459–6464.

Lu YY, Zeng L, Wang L, Xu YJ, Chen KW, 2008. Precaution of solenopsis mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. *Journal of Environmental Entomology*, 30(4): 386–387. [陆永跃，曾玲，王琳，许益镌，陈科伟，2008. 警惕一种危险性绵粉蚧入侵中国. 环境昆虫学报，30(4): 386–387]

Ma J, Hu XN, Peng ZQ, Liu HJ, Liang F, Lu YY, 2011. The potential geographical distribution of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley based on the CLIMEX in China. *Plant Quarantine*, 25(1): 5–8. [马骏，胡学难，彭正强，刘海军，梁帆，陆永跃，2011. 基于 CLIMEX 模型的扶桑绵粉蚧在中国潜在地理分布预测. 植物检疫，25(1): 5–8]

Matta BP, Bitner-Mathe BC, Alves-Ferreira M, 2011. Getting real with real-time qPCR: a case study of reference gene selection for morphological variation in *Drosophila melanogaster* wings. *Development Genes and Evolution*, 221(1): 49–57.

Niu JZ, Dou W, Ding TB, Yang LH, Shen GM, Wang JJ, 2012. Evaluation of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during development and abiotic stress in *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). *Molecular Biology Reports*, 39(5): 5841–5849.

Peng R, Zhai YF, Ding H, Di TY, Zhng T, Li B, Shen WD, Wei ZG, 2012. Analysis of reference gene expression for real-time PCR based on relative quantitation and dual spike-in strategy in the silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochimic et Biophysica Sinica*, 44(7): 614–622.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6): 509–515.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A, 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4): 856–862.

Ransbotyn V, Reusch TBH, 2006. Housekeeping gene selection for quantitative real-time PCR assays in the seagrass *Zostera marina* subjected to heat stress. *Limnology and Oceanography: Methods*, 4: 367–373.

Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Brunain M, Peelman LJ, Jacobs FJ, 2008. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: the head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *Journal of Insect Science*, 8(33): 1–10.

Sun F, Lu YY, 2011. A new invasive mealybug, *Phenacoccus solenopsis*, could cause serious damage to cotton plants. *China Cotton*, 38(2): 19–20. [孙峰，陆永跃，2011. 新入侵害虫扶桑绵粉蚧严重危害棉花. 中国棉花，38(2): 19–20]

Thomas A, Ramamurthy VV, 2014. Morphological and molecular studies on the intraspecific variations between populations of the cotton mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Entomological News*, 123(5): 339-347.

Tinsley JD, 1898. Notes on Coccidae with descriptions of new species. *Canadian Entomologist*, 30(12): 317-320.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7): research0034.

Wu SA, Zhang RZ, 2009. A new invasive pest, *Phenacoccus solenopsis*, threatening seriously to cotton production. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1): 159-162. [武三安, 张润志, 2009. 威胁棉花生产的外来入侵新害虫—扶桑绵粉蚧. 昆虫知识, 46(1): 159-162]

Wu WK, Liu CQ, Zhou ZG, Lu S, 2009. The selection of reference genes in *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard by real-time quantitative PCR. *Plant Physiology Communications*, 45(7): 667-672. [吴文凯, 刘成前, 周志刚, 卢山, 2009. 用于莱茵衣藻荧光定量 PCR 分析的内参基因选择. 植物生理学通讯, 45(7): 667-672]

Xie FL, Sun GL, Stiller JW, Zhang BH, 2011. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database. *PLoS ONE*, 6(11): e26980.

Yan H, Jia H, Wang X, Gao H, Guo X, Xu B, 2013. Identification and characterization of an *Apiscerana cerana* Delta class glutathione S-transferase gene (*AccGSTD*) in response to thermal stress. *Naturwissenschaften*, 100(2): 153-163.

Yang LH, 2011. Study on Mechanisms of *Panonychus citri* (MeGregor) in Response to Thermal Stress. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. 99-106. [杨丽红, 2011. 柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor) 对热胁迫的响应机制研究. 重庆: 西南大学博士学位论文. 99-106]

Yang SY, Yue XL, Wang JJ, Shen HM, 2013. Screening of suitable reference genes and expression profiling of CYP392E subfamily genes in different resistant strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(10): 1152-1159. [杨顺义, 岳秀利, 王进军, 沈慧敏, 2013. 二斑叶螨不同抗性品系最佳内参基因的筛选及 CYP392E 亚家族基因的表达分析. 昆虫学报, 56(10): 1152-1159]

Yoo WG, ImKim T, Li S, Kwon OS, Cho PY, Kim T, Kim K, Hong S, 2009. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR. *Parasitology Research*, 104(2): 321-328.

Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR, Li J, 2014. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9(1): e86503.

Yue XL, Gao XJ, Wang JJ, Lv JJ, Shen HM, 2013. Selection of reference genes and study of the expression levels of detoxifying enzymes of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 46(21): 4542-4549. [岳秀利, 高新菊, 王进军, 吕娟娟, 沈慧敏, 2013. 二斑叶螨内参基因的筛选及解毒酶基因的表达水平. 中国农业科学, 46(21): 4542-4549]

Zhang YJ, Zhu ZF, Lu R, Xu Q, Shi LX, Jian X, Liu JY, Yao Z, 2007. Selection of control genes in transcription analysis of gene expression. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 34(5): 546-550. [张艳君, 朱志峰, 陆融, 徐琼, 石琳熙, 简序, 刘俊燕, 姚智, 2007. 基因表达转录分析中内参基因的选择. 生物化学与生物物理进展, 34(5): 546-550]

(责任编辑: 赵利辉)